自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 对皮肤创伤快速修复过程的研究

张慧楠[1] 李萌萌[1] 文静[1] 吴书祎[1] 兰世建[1] 罗忠礼[1**]

1:重庆医科大学基础医学院，分子医学与肿瘤研究中心，重庆，400016;

摘　要 研究探索自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 在人皮肤成纤维细胞体外三维培养的应用效果与对创伤修复过程的作用。通过圆二色谱仪分析不同时间、温度和离子条件对其二级结构的影响；刚果红染色宏观检测短肽自组装情况；体外培养人皮肤成纤维细胞探索细胞在 $R_2I_4R_2$ 形成的纳米纤维网络中的生长状态及凋亡情况；建立SD大鼠皮肤创伤模型，HE染色与免疫组织化学检测其对皮肤创伤修复的病理变化。结果表明，$R_2I_4R_2$ 在不同条件下均可形成较为稳定的二级结构；自组装24h后可形成均一稳定的膜片状装结构，为细胞三维培养提供支架；人皮肤成纤维细胞可在 $R_2I_4R_2$ 形成的纳米纤维网络三维环境中生长且状态良好；动物实验表明，短肽 $R_2I_4R_2$ 可减少炎症、促进新生血管生成、加速皮肤创伤修复过程。自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 作为新的纳米支架材料，可用于细胞三维培养与皮肤创伤修复。

【关键词】自组装短肽；皮肤创伤修复；细胞三维培养

中国分类号 R318.08

Self-assembling Peptide $R_2I_4R_2$ For Skin Wounds Repairing

ZHANG Hui-nan[1] LI Meng-meng[1] WEN Jing[1] WU Shu-yi[1] LAN Shi-jian[1] LUO Zhong-li[1**]

1: The College of Basic Medical Sciences, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016;

Abstract

This study is proposed to understand the application of self-assembling peptide $R_2I_4R_2$ 3D cell culture human skin fibroblast in vitro and the role of the wound healing process. Circular dichroism was used to analysis its secondary structure influenced by different time, temperature and ion environment; Congo red staining was used to obtain the macro change of $R_2I_4R_2$ hydrogel;

*国家自然科学基金资助项目(31540019)、重庆市基础与前沿研究(重点) 资助项目 CQ (CSTC) (cstc2015jcyjBX0072)、国家自然科学基金（31771101）资助项目

**通讯作者，电子信箱：Zhongliluo@163.com

$R_2I_4R_2$ was used to 3D cell culture material to get the growth state of human skin fibroblast cell strain; AO / EB staining was used to study cell apoptosis in 3D culture environment;SD rat skin wound healing model was founded to check pathological changes by HE staining and immunohistochemical staining. These results indicated that $R_2I_4R_2$ can form a stable secondary structure in some conditions;24 hours after self-assembling, $R_2I_4R_2$ can form a homogeneous and stable membrane-like structure for 3D cell culture; Human skin fibroblasts had a hearty growing situation in hydrogel; The data in animal experiments show that $R_2I_4R_2$ can reduce inflammation, promote neovascularization, accelerate the skin wound repair process. Our studies demonstrate this short peptide can be used to a new material in 3D cell culture and skin trauma repairing and beyond.

【key words】Self-assembling peptide;skin wounds repairing;3D cell culture

引言

皮肤作为人体免疫的第一道屏障，在机体保护、维持人体内环境等方面具有重要作用。同时，皮肤因面积较大、直接接触外界等原因，也是极易受到创伤的器官之一[1]。近年来，皮肤创伤伤员数量不断增加，同时因截瘫、糖尿病、局部射线照射等造成的慢性难愈性创面也日益增多[2]。皮肤创伤的异常恢复不仅会影响人体美观，更会造成皮肤及相关器官的结构与功能性障碍。

在创伤修复过程中各类因子与细胞外基质（extracellular matrix ECM）在创伤修复过程中协同发挥作用，完成炎症期—肉芽组织形成期—组织塑形期的创伤修复过程。其中包括炎症因子（IL-6,IL-1 等）[3]、细胞因子（TGF-α、CD34 等）[4]、生长因子（EGF,VEGF 等）[5]。ECM 为细胞外基质，可连接和支撑细胞，同时，ECM 也可促进和调节细胞的生物学行为。在创伤修复过程中，ECM 可保护修复细胞，也可促进创面形成胶原层，加速伤口收缩，修补破损组织[6]。

自组装短肽是一种仿 ECM 生物支架的纳米生物医学材料，能模拟 ECM 的部分功能，且具有良好的生物相容性。自组装短肽可降解为氨基酸残基，无细胞毒性，可在体外模拟细胞体内生长的三维环境，支持细胞的生长与分化[7]。我们团队在过去研究的基础上，发现了一类短肽在再生修复方面都有一定作用效果。本研究选用自组装的短肽 $R_2I_4R_2$ 由 8 个氨基酸构成，考察了它的自组装效果与影响因素，通过体外细胞培养研究了人皮肤成纤维细胞（HFF-1）在短肽 $R_2I_4R_2$ 水凝胶中的培养状况，体内实验研究了短肽 $R_2I_4R_2$ 对 SD 大鼠皮肤创伤的修复效果等。与其他生物材料相比，该自组装短肽对细胞及组织没有毒害作用。本研究表明，相比其他生物材料更有优势，它在创伤修复等领域可能具有重要的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所使用的 $R_2I_4R_2$ 短肽粉末由成都赛恩贝生物技术有限公司赠送；PBS 磷酸缓冲液粉剂、丫啶橙/溴化乙锭（AO/EB）溶液柠檬酸抗原修复液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；4%多聚甲醛固定液、DAB 显色试剂盒购自上海碧云天生物技术公司；胎牛血清购自美国 Sciencell 公司；青链霉素混合液购自美国 Genview 公司；高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司；免疫组化染色试剂盒购自北京中杉新桥生物技术有限公司；鼠抗 VEGF 抗体、鼠抗 CD_{34} 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 短肽二级结构测试 不同组装时间对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响：用 PBS

配置浓度为 0.1mM 的短肽，取 400 μL 于石英比色皿中，在室温下分别于组装后 0 h，4 h，6 h，8 h，22 h 进行 CD 检测(扫描波长 190-260nm)。

不同温度对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响：用 PBS 配置浓度为 0.1 mM 的短肽，测量温度 20-95 ℃，温度步长 2 ℃，扫描波长 190-260 nm。

不同离子对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响：分别用 PBS，0.15 mM NaCl，15 mM $MgCl_2$，配置浓度为 0.1 mM 的短肽取 400 μL 于石英比色皿中，进行 CD 检测(扫描波长 190-260 nm)。

输出测量值，根据以下公式计算[θ]值，后以波长为横坐标，[θ]为纵坐标作图。

[θ]=[m(deg)]/[10(peptide)ln]

注：m 为机器值；（peptide）为短肽相对分子质量；l 为仪器光径（0.2 cm）；n 为短肽氨基酸数。

1.2.2 刚果红染色观察 R2I4R2 自组装宏观变化 自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 的刚果红染色：分别用 PBS 与 0.15 mM NaCl 配置 5 mg/ml 的 $R_2I_4R_2$ 短肽溶液，在室温下孵育 24 h。在自组装 0 h，4 h，24 h 时，取 10 μl 短肽水凝胶于载玻片上，刚果红染色 30 s 后，在光镜下观察短肽成胶情况。

1.2.3 HFF-1 细胞二维、三维培养体系构建

二维细胞培养

将 HFF-1 细胞接种至培养瓶中，加入含 15%胎牛血清，1%青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基，将细胞置于 37 ℃，5%CO_2 培养箱中培养，至细胞覆盖率 90%左右时，胰蛋白酶消化传代，用于后续实验。

三维细胞培养

待细胞贴壁生长覆盖率约 90%时进行三维培养。于 4 ℃冰箱中取出 $R_2I_4R_2$ 短肽粉末，加入 1 ml 无酶水溶解为 10 mg/ml 的短肽水溶液，4 ℃冰箱保存待用。胰蛋白酶消化细胞，1000 r/min 离心 5 min，弃上清后加入 1 ml 培养基进行细胞计数。调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml。每孔取 50 μl 细胞悬液与 50 μl 短肽溶液混合均匀，混合后迅速加入到 96 孔板中。将孔板置于 37 ℃，5%CO_2 培养箱中培养 10 min，待其自组装形成三维培养环境后，每孔轻轻加入 100 μl15%胎牛血清，1%青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基，置于 37 ℃，5%CO_2 培养箱中培养。

1.2.4 HFF-1 细胞在三维环境中的丫啶橙/溴化乙锭（AO/EB）染色 为检测人皮肤成纤维细胞（HFF-1）在二维与三维环境中的生长情况与细胞活性，本研究采用丫啶橙/溴化乙锭（AO/EB）染色观察细胞形态学变化。

①称取丫啶橙与溴化乙锭各 1 mg，分别溶于 10 ml PBS 中配成 0.1 mg/ml 的母液，滤过，于 4 ℃冰箱中保存，需要时等体积混合，现配现用。②分别在细胞三维培养 1 d，3 d，5 d，7 d，9 d 时进行染色。染色前用 4%多聚甲醛固定 10 min，每孔加入 AO-EB 染料 10 μl，室温避光染色 10-15 min，PBS 清洗 2-3 次，每 5min 于荧光显微镜下观察染色结果。

1.2.5 HFF-1 细胞在三维环境中的 cck-8 (cell counting kit-8)检测 为检测人皮肤成纤维细胞（HFF-1）在二维与三维环境中的生长情况，采用 cck-8 检测细胞增值情况。

①分别在二维与三维环境下于 96 孔板中培养 HFF-1 细胞。②分别在细胞培养 1、3、5 天进行检测。③向每孔中加入 10μl cck-8 溶液。④避光于培养箱中孵育 4h。⑤用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值。

1.2.6 SD 大鼠皮肤创伤修复情况 取成年大鼠雌雄各半，腹腔麻醉后，在其背上打 2 个直径约 0.8 cm 的圆形创面，创面深度到皮下筋膜层。分别给药生理盐水与 $R_2I_4R_2$（5 mg/ml）。术后 1，3，5，7，15，21 天观察其修复情况、测量伤口面积并取样。4%多聚甲醛固定 48 h，石蜡包埋并连续切片。用于 HE 染色与免疫组织化学染色研究。

1.2.7 HE 染色 ①脱蜡：二甲苯Ⅰ，1 h；二甲苯Ⅱ，10 min。②水化：100%酒精，3 min；95%酒精，3 min；80%酒精，3 min；70%酒精，3 min；自来水冲洗，3 min。③染色：苏木精染液染色 5 min；自来水冲洗后镜检；定染 30 s；伊红染液染色 10 min；70%酒精，1 min；80%酒精，1 min；95%酒精，1 min；100%酒精Ⅰ，1 min；100%酒精Ⅱ，3 min。④透明：二甲苯Ⅰ，15 min；二甲苯Ⅱ，15 min。⑤封片。⑥光学显微镜观察。

1.2.8 免疫组织化学染色 ①脱蜡：二甲苯Ⅰ，1 h；二甲苯Ⅱ，10 min。②水化：100%酒精，3 min；95%酒精，3 min；80%酒精，3 min；70%酒精，3 min；自来水冲洗，3 min。③0.1 M柠檬酸盐溶液加热进行抗原修复。④3%H_2O_2孵育 15 min阻断内源性过氧化物酶。⑤非特异性染色阻断剂 37 ℃孵育 30 min。⑥一抗 4 ℃孵育过夜。⑦复温：37 ℃，30 min。⑧二抗 37 ℃孵育 30 min。⑨链霉素-过氧化物酶 37 ℃孵育 30 min。⑩DAB显色。⑪苏木素复染细胞核。⑫封片。⑬光学显微镜观察。

2 结果

2.1 圆二色谱检测不同理化因素对 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响

2.1.1 自组装时间对 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响

结果显示，随着自组装时间的增加，短肽 $R_2I_4R_2$ 的特征峰吸光度先减小后增加，表示短肽 $R_2I_4R_2$ 的二级结构随着自组装时间的增加逐渐趋向稳定。

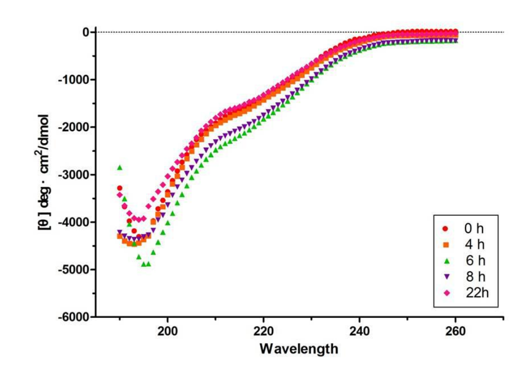


图 1 不同自组装时间对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响.

Figure 1 Self-assembling time influence to the secondary structure of $R_2I_4R_2$ by PBS(peptide concentration:0.1 mM) after 0 h, 4 h, 6 h,8 h, 22 h.

2.1.2 不同温度对 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响

温度介于 25 到 60 ℃，该肽性质稳定；随着温度的增加，短肽 $R_2I_4R_2$ 的特征峰吸光度逐渐增加，当温度增加至 95 ℃时，定性分析二级结构的 α 结构成份有轻微向 β 结构改变，表示温度过高会对短肽 $R_2I_4R_2$ 的二级结构的稳定性会有影响。

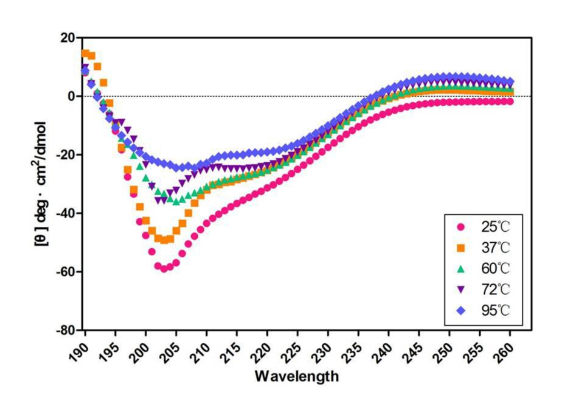


图 2 不同温度对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响.

Figure 2 Temperature influence to the secondary structure of $R_2I_4R_2$ Peptide concentration were 0.2 mM dissolved in PBS.

2.1.3 不同离子对 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响

金属离子对短肽的二级结构有一定的影响。以 PBS 为对照，考察相同阴离子（Cl^-）中的阳离子 Na^+ 和 Mg^{2+}， 对短肽二级结构影响。CD 光谱结果显示，自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 在 15 mM Mg^{2+}中，相同波长处光谱信号更强，二级结构趋于更加稳定。

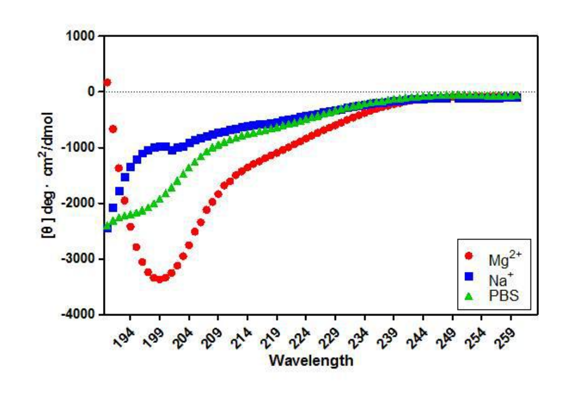


图 3 不同离子对自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 二级结构的影响

Figure 3 Various ions influence to the secondary structure of $R_2I_4R_2$ at 25 ℃ cultured in difference salt solution:0.15 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$, PBS(pH=7.2), peptide concentration 0.1 mM.

2.2 刚果红染色观察 $R_2I_4R_2$ 自组装宏观变化

刚果红染色显示，自组装 0 h 时，短肽结构较为松散，呈流沙状；4 h 时，出现较为稀疏的膜片状结构；自组装 24 h 后，短肽可形成均一、稳定的膜片状结构。初步推测 $R_2I_4R_2$ 在一定条件下，可作为细胞三维培养的基质材料。

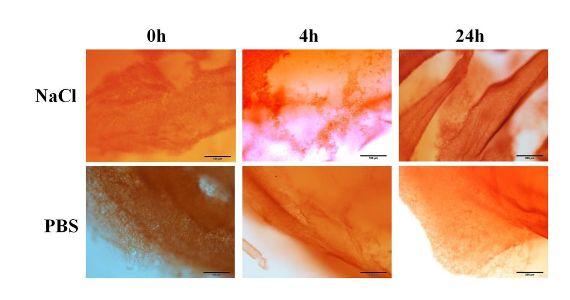


图 4 自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 的刚果红染色图

Figure 4 Congo red images of self-assembling peptide $R_2I_4R_2$.

2.3 光学显微镜检测 HFF-1 细胞在二维、三维环境中的生长状态

人皮肤成纤维细胞（HFF-1）在二维环境中为贴壁状态，呈长梭形；在三维环境中，细胞呈球形，边界清晰、状态良好且为多层生长。培养 7 天后，二维环境组细胞出现接触抑制，开始漂浮、死亡；而三维环境中细胞仍然透亮。证明 HFF-1 细胞可以在自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 形成的三维环境中生长且长势良好。

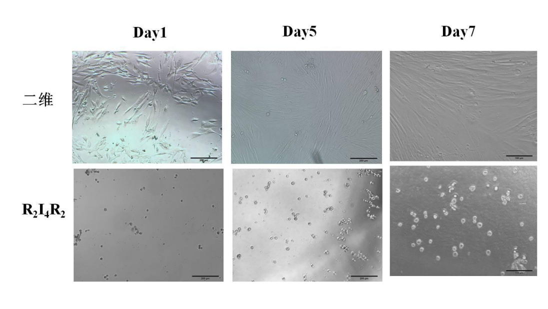


图 5 HFF-1 细胞在 R2I4R2 形成的三维环境中的培养情况.

Figure 5 HFF-1 culture in 3D microenvironment of $R_2I_4R_2$.

2.4 丫啶橙/溴化乙锭（AO/EB）染色检测 HFF-1 细胞活性

AO/EB 染色后，活细胞核染色质着绿色且呈正常结构，早凋细胞核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状，死亡细胞核染色质着橘红色并呈正常结构，晚凋细胞核染色质着橘红色呈固缩状活圆珠状。由 AO/EB 染色结果可以看出，HFF-1 细胞在自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 构建的三维环境中，细胞呈绿色，长势良好，7 天后开始出现少量凋亡。

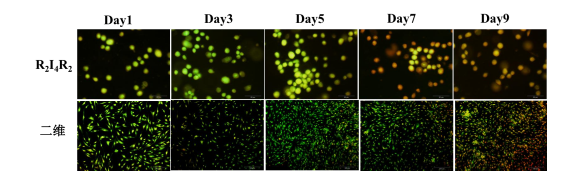


图 6 HFF-1 细胞在三维培养中的 AO/EB 染色图

Figure 6 Image of AO/EB staining of HFF-1 in 3D microenvironment of $R_2I_4R_2$.

2.5 HFF-1 细胞在三维环境中的 cck-8(cell counting kit-8)检测

cck-8 细胞增值情况检测显示：HFF-1 细胞在让 $R_2I_4R_2$ 构建的三维环境中增值较慢，但无细胞数量减少现象。说明 HFF-1 细胞可在 $R_2I_4R_2$ 构建的三维环境中生长。证明短肽 $R_2I_4R_2$ 对细胞的生长增值无毒害作用。

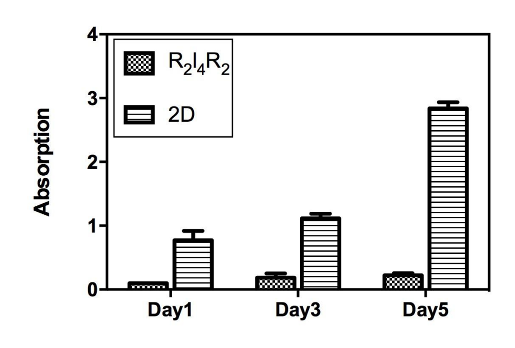


图 7 HFF-1 细胞在三维环境中的 cck-8 检测

Figure 7 Image of cck-8 of HFF-1 in 3D microenvironment of R2I4R2.

2.6 SD 大鼠皮肤创伤模型修复情况

SD 大鼠皮肤创伤模型伤口面积变化情况显示：1-21 天，实验组较对照组伤口面积恢复更快；21 天时，实验组伤口面积仅为原始创伤面积的 12%，对照组伤口面积为原始创伤面积的 17.7%；实验组创伤面积恢复速率约为对照组的 1.07 倍。

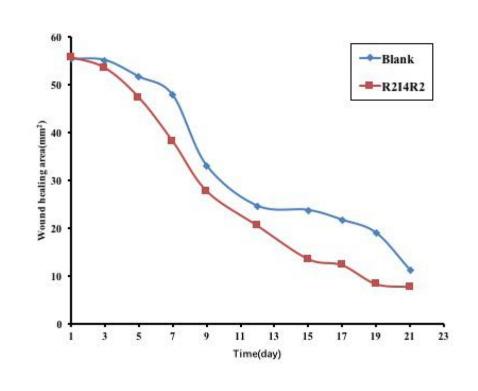


图 8 SD 大鼠皮肤创伤模型伤口面积恢复图

Figure 8 Image of Wound area recovery in SD rats skin wound model

2.7 皮肤组织 HE 染色

HE 染色结果显示：5 d 时，实验组炎症细胞较对照组多，且呈聚集化，实验组有少量毛细血管生成趋势；7 d 时，肉芽组织增生，实验组较对照组肉芽组织更多更厚，毛细血管生成量也较对照组更多；15 d 时，实验组较对照组表皮层明显增厚，新生组织开始向瘢痕组织转化。

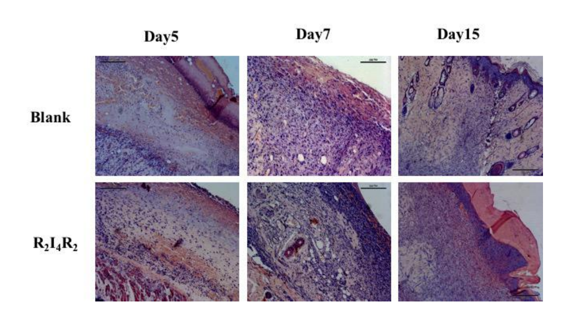


图 9 短肽 $R_2I_4R_2$ 对皮肤创伤快速修复的 HE 染色图

Figure 9 Image of HE staining of skin sound healing in peptide $R_2I_4R_2$

2.8 免疫组织化学染色

选择组织创伤修复中的重要蛋白血管内皮生长因子 VEGF 与细胞因子 CD34 进行免疫组织化学染色研究。结果显示：7 d 时，实验组较对照组 CD34 表达量更高;15 d 时，实验组与对照组 CD34 表达量都很少。7 d 时，实验组与对照组 VEGF 表达量都较高，但实验组表达量更高，且分布集中在伤口前端，对照组 VEGF 分布较为松散。15 d 时，对照组几乎没有 VEGF 表达，而实验组仍有较高表达。

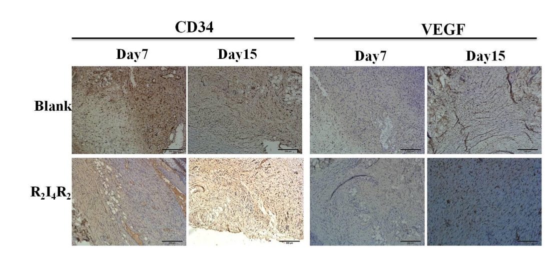


图 10 短肽 $R_2I_4R_2$ 对皮肤创伤快速修复的免疫组织化学染色（100×）.

Figure 10 Image of Immunohistochemical staining of skin sound healing in peptide $R_2I_4R_2$.

3 讨论

皮肤创伤是日常生活中常见但不可轻视的疾病，严重创伤患者，其皮肤表面细胞微环境被破坏，较难实现自我修复。目前，市面上治疗创伤修复的敷料主要集中在止血、活血化瘀等方面。其与人体内细胞外微环境相距甚远，部分敷料还可能增加伤口清创难度、引起炎症反应。而自组装短肽组建的纳米纤维支架可较好的模拟细胞外基质，即人体内细胞外环境。此外，自组装的降解产物为氨基酸，有利于人体的吸收和排放，相比传统敷料具有一定优势[8]。

本研究所选用的自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 在 37℃时可自组装形成稳定的二级结构；在盐离子中可自组装形成网状纳米纤维支架，且在不同条件下都具有较为稳定的二级结构；短肽水凝胶可较好地模拟细胞外基质 ECM[9]，同时也可作为体外细胞三维培养的支架材料，能够为 HFF-1 细胞的生长与增值提供更接近体内环境的细胞培养环境[10]；HFF-1 细胞可在自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 形成的三维体系中生长且细胞状态良好；实验表明 HFF-1 在短肽形成的水凝胶中可存活较长时间；在创伤修复体内实验中表明，以自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 作为敷料可减少炎症发生、促进新生血管形成、上调生长因子与细胞因子含量、加速修复过程。

本课题属于交叉学科的前沿领域，旨在从短肽二级结构、体外细胞实验、体内动物实验三方面探索自组装短肽 $R_2I_4R_2$ 对创伤修复过程的影响，本基础研究成果可为皮肤创伤等再生修复的临床治疗提供新策略和新思路，具有较强的理论价值和市场应用前景。

致谢 感谢重庆医科大学科研培训基金(201417)、重庆医科大学基础医学院苗圃基金(JC201514)对本研究的支持与资助。

参考文献

[1]Li A,Dearman BL，Crompton KE，et al. Evaluation of a novel biodegradable polymer for the generation of a dermal matrix.J Burn Care Res，2009，30(4):717-28

[2]景海波，潘立群.创伤修复研究进展[J].辽宁中医药大学学报，2012,2012（11）：210-212

Jing HB，Pan LQ.Recent Advances in Wound Repair.JOURNAL OF LIAONING UNIVERSITY OF TCM，2012，2012 (11):210-212

[3]Bodnar RJ.Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing.Adv Wound Care (New Rochelle)，2015，4(11):641-650

[4]Heng MC.Wound healing in adult skin:aiming for perfect regeneration.Int J Dermatol , 2011 , 50(9):1058-66

[5]Stalmans I，Vandewalle E，Van Bergen T.Vascular endothelial growth factor(VEGF) and modulation of wound healing after glaucomasurgery. Verh K Acad Geneeskd Belg，2010，72(1-2):41-53

[6] 陈振银，岳媛媛，张慧楠，等.自组装短肽 GFS-4 作为细胞三维培养及心肌梗死修复支架材料的研究[J]. 生物医学工程学杂志，2017，2017 (03):388-393

Chen ZY， Yue YY， Zhang HN，et al. Self-assembling peptide GFS-4 nanofiber scaffolds for three-dimensional cell cultures and myocardial infarction repair . Journal of Biomedical Engineering，2017，2017 (03):388-393

[7]Luo Z,Yue Y，Zhang Y，et al. Designer D-form self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3-dimensional cell cultures. Biomaterials , 2013,34(21):4902-13

[8]Liu X，Wang XM，Wang XJ，et al. Functionalized selfassembling peptide nanofiber hydrogels mimic stem cell niche to control human adipose stem cell behavior in vitro.Acta Biomater，2013,9(6): 6798-6805

[9]Luo Z，Zhang S.Designer nanomaterials using chiral self-assembling peptide systems and their emergingbenefit for society.Chem Soc Rev , 2012,41(13):4736-54

[10]Luo Z , Wang S , Zhang S.Fabircation of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis.Biomaterials , 2011 , 32(8):2013-20